

• 实验研究 •

活血化癥药丹参治疗骨折的超微结构研究

上海市伤骨科研究所 柴本前

上海第二医科大学 汤雪明

内容摘要 本文观察丹参对家兔骨折修复的影响。X线检查证实丹参可使骨折部位骨痂形成提前出现，且更为致密。透射电镜观察表明，丹参可使：(1) 骨生成细胞分布部位及数量增加；(2) 成纤维细胞除有外形改变外，细胞的蛋白质合成活动更为旺盛，细胞的正常变性过程也加快，细胞外胶原纤维增多，并进入成纤维细胞的胞质内；(3) 有增多的破骨细胞出现在不同的骨痂部位，促进骨的改建；(4) 成纤维细胞肿胀的线粒体内出现众多的致密钙颗粒，从而使骨痂有更多更早的钙盐沉积。

我们以往通过光学显微镜观察，生化及同位素测定(1~3)，曾发现某些中药对骨折愈合有一定作用，使修复可在更有利的条件下进行。本文进一步就活血化癥中药丹参对骨折愈合的影响进行透射电子显微镜观察，以阐明其机理。

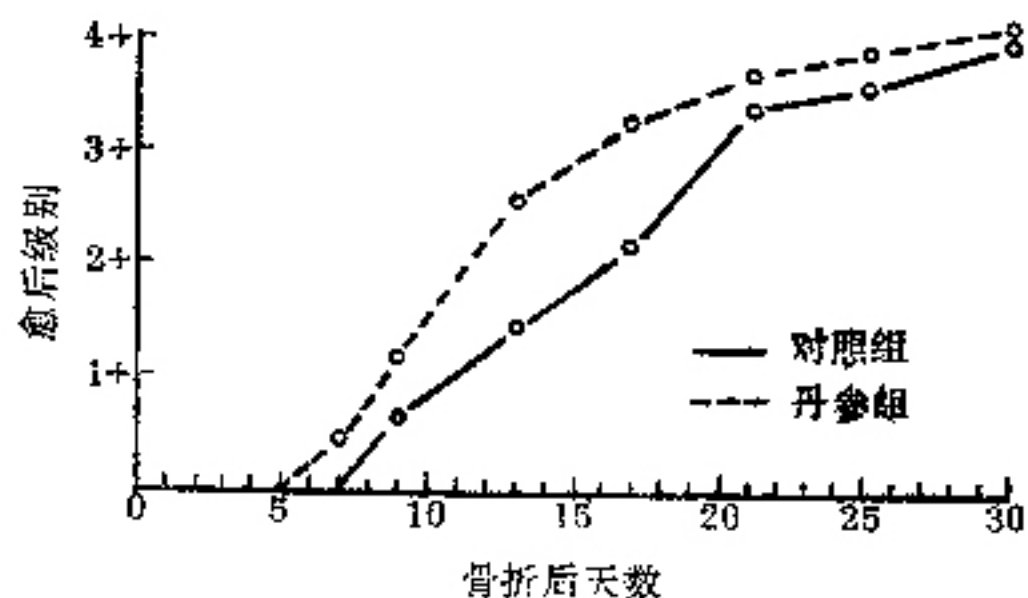
材料与方法

实验共用50只雄性健康新西兰家兔，体重2~3kg。于无菌技术及戊巴比妥钠(30mg/kg)静脉麻醉下，按常规方法在两桡骨旋前圆肌肌止的远端造成3mm宽缺损的标准骨折(4)。手术当天肌肉注射丹参注射液2ml，以后每天一次，注射最多不超过13次。家兔处死当天不注射。术后在1、3、5、7、9、13、17、21、25、30天分十批处死，每批各处死家兔5只。每批家兔处死后立即取下左桡骨5个部位的骨痂(骨外膜骨痂，桥梁骨痂，连接骨痂，近端封闭骨痂及远端封闭骨痂)；各骨痂标本经处理后在H-500电镜下观察(4)。右桡骨经X线摄片，按5级评定法测定每批5个标本的X线平均骨折愈合的情况(2)，然后将右桡骨骨折部位经常规处理在光学显微镜下观察。

结 果

一、骨折愈合的X线评定：根据骨折断端边缘情况，骨外膜反应情况，骨折缺损内骨痂量、密度、边缘情况(2)。将丹参治疗的桡骨骨折愈合同对照组桡骨骨折愈合进行比较(4,5)；该对照组也包括50只家兔，除造成骨折后每天注射生理盐水2ml外，其他实验条

件完全相同。比较结果可看到丹参组愈合较对照组为快，特别在骨折后第9天至第21天之间的差别更为明显(附图)，充分说明丹参对骨折愈合的有利作用。



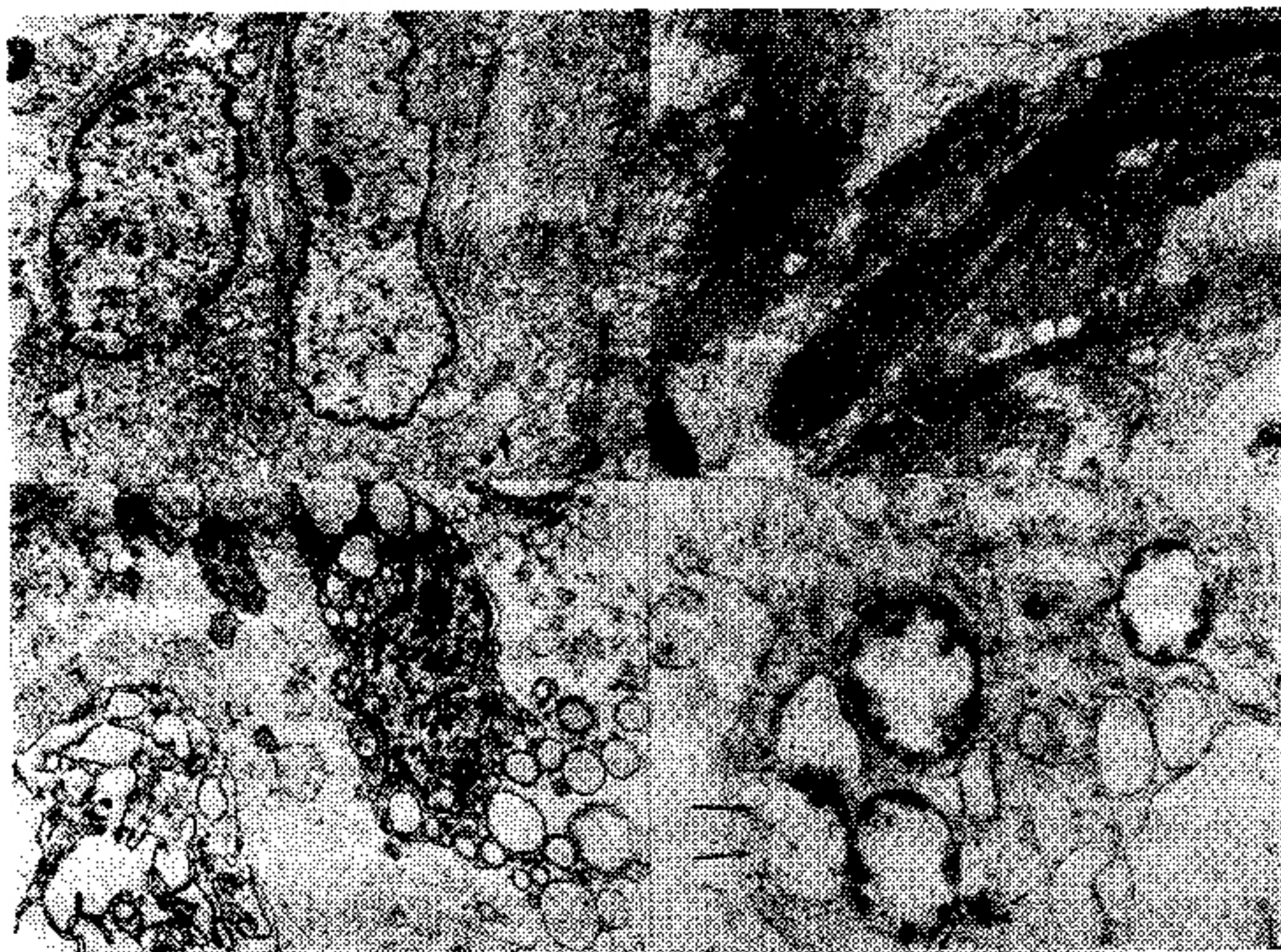
附图 按5级法评定丹参组与对照组的桡骨骨折愈合X线情况比较

二、骨折愈合的透射电镜观察：在应用丹参治疗期间，家兔桡骨骨折愈合的不同阶段中，出现一些与对照组不相同的超微结构表现：

骨生成细胞(osteogenic cell)：对照组骨生成细胞多见于骨外膜骨痂及桥梁骨痂中。丹参治疗的骨生成细胞在数量上及分布部位上均见增加。这些细胞除了存在于上述二种骨痂外，还可在连接骨痂和近端封闭骨痂内看到(照片1)。

2. 成纤维细胞：对照组成纤维细胞具有不规则的长方形，而丹参组成纤维细胞出现狭长的形态，包括狭长的细胞核。细胞的四周有无数的胶原纤维。

成纤维细胞核的变化更多。有些处在骨髓腔内的成纤维细胞的蛋白质分泌活动依然很旺盛，粗面内质网明显膨大成池。有一部分粗面内质网及池陷入细



照片1 17天连接骨痂：两个并列的骨生成细胞，细胞核内常染色质占优势，有核仁；细胞质内有线粒体(箭头)及粗面内质网， $\times 11500$ ；照片2 13天连接骨痂，成纤维细胞呈凝集变化，核内异染色质条纹形成及拉长现象， $\times 13780$ ；照片3 13天骨外膜骨痂，成纤维细胞粗面内质网有水泡形成，有些水泡膜发生脱颗粒现象，有些则形成厚壁， $\times 21000$ ；照片4 25天桥梁骨痂，成纤维细胞的四个肿胀线粒体内有许多高电子密度的钙颗粒可见，有7个钙颗粒(小箭头)已脱出残缺的线粒体膜(大箭头)进入细胞质， $\times 31780$

胞核的袋形凹陷内，有的则形成一个核内包涵体。有些成纤维细胞有核仁，核仁出现着边现象，或者正在发生着边现象。多数有明显变性变化的成纤维细胞内，细胞核除了固缩外，还可以看到异染色质的条纹成形现象。开始时，条纹出现在核基质部位，而四周的异染色质趋向于均化。逐渐整个核内的异染色质均变为条纹状，而细胞核亦同时出现明显的拉长现象。然后一束束的条纹自核分离出来，并散布在已经深度变性的细胞质内(照片2)。

粗面内质网变化，在分泌功能旺盛的成纤维细胞中，粗面内质网除了膨大成泡外，还出现众多的内质网水泡形成。水泡内可见电子密度稍深的溶胶原。在水泡的膜上发生脱颗粒现象，使这些水泡状的粗面内质网膜上仅有比较稀少的核糖体颗粒可见，因之很像光面内质网。相反，在另一些水泡形粗面内质网的边缘却有比较多的核糖体颗粒以及细颗粒存在；这样，就构成了厚壁的粗面内质网水泡。这些厚壁水泡内也有溶胶原(照片3)。

3. 破骨细胞：自应用丹参第7天开始在各部位的骨痂内即可发现较多的破骨细胞，且往往在一处可看

到一群破骨细胞围在一堆骨组织的边缘，这与对照组中破骨细胞的情况形成明显的对比。

4. 胶原纤丝：凡成纤维细胞出现处，其四周均有大量的胶原纤丝密集。胶原纤丝排列不规则，无一定明显的方向，呈相互交叉镶嵌，显示一片比较杂乱的图象。

胶原纤丝分泌形成多者不仅可以在成纤维细胞四周看到，同样也可以从成纤维细胞细胞质内出现的纤丝反映出来。对照组骨折愈合过程中，在成纤维细胞细胞膜大段脱落的情况下，细胞四周的胶原纤丝可以通过无细胞膜的部位进入细胞质内。由于应用丹参，有比较多成纤维细胞四周的钙化胶原纤丝通过细胞膜缺口进入细胞质内。有的甚至已进入有脱颗粒变性并有缺口的粗面内质网内。这种情况在对照组中从未见到。

5. 线粒体：丹参使成纤维细胞的线粒体极度肿胀，并使肿胀的线粒体内出现众多的致密钙颗粒。这些钙颗粒的电子密度极高，而与四周的细胞质及细胞器形成明显对比。致密钙颗粒大多座落在贴近线粒体膜的嵴上面，因而都在边缘部位；也有少数钙颗粒处

在线粒体基质内。钙颗粒的大小相仿,但其数目多寡不一,似与线粒体的肿胀程度有关。钙颗粒可以通过线粒体膜的残缺处而进入细胞质(照片4)。

讨 论

通过 ^{51}Cr -铬酸钠标记的红细胞测定血容量,发现在骨折愈合过程中,应用丹参可以减少骨折局部的早期充血以及增加骨折局部的血循环,从而产生一个对骨折有利的影响⁽³⁾。这种有利的影响也必然反映到细胞活动过程中。本研究已经充分观察到骨生成细胞、成纤维细胞及破骨细胞所出现的变化。

骨生成细胞是成骨细胞、成软骨细胞的干细胞^(5,6),这些细胞在骨折愈合中均起积极作用,应用丹参后,骨生成细胞既能比较广泛持续地出现,就可以为骨折愈合提供各种必需的细胞而发挥积极有利的作用。

成纤维细胞在骨折愈合中不仅可以分泌、形成胶原纤维⁽⁴⁾,而且还产生基质小泡引起钙化与骨化⁽⁷⁾,可以在细胞四周的胶原纤维内沉积钙盐⁽⁴⁾,可以直接演变为骨细胞,即使成纤维细胞发生变性以致死亡,它仍可以被骨组织所替代^(5,6)。在本实验中,经用丹参后,成纤维细胞核仁有着边现象,这是细胞快速生长、蛋白质合成增加的一种表现。因为核仁涉及在RNA的产生与分布过程中,是核糖体RNA前身的合成部位⁽⁹⁾,所以核仁着边现象直接说明了用药以后蛋白质合成旺盛。同样,成纤维细胞核内陷及核内出现包涵体的情况反映了丹参使细胞质容量增加,特别是使形成胶原的粗面内质网容量增加,从而使粗面内质网突入核中⁽¹⁰⁾,所以核内包涵体的出现间接说明用药以后旺盛的蛋白质合成。至于粗面内质网的水泡形成可以由二种原因所造成,一种是因水及溶质进入内质网所致,即是混浊膨胀的一种表现;另一种原因是成纤维细胞在粗面内质网内储存已经形成的溶胶原而使内质网膨大成水泡⁽¹¹⁾。由于水泡内可以清晰地看到溶胶原,因之粗面内质网水泡形成只能说明成纤维细胞由于应用丹参而形成更多的溶胶原。

由于上述各种原因而使胶原纤维量多而密集,并且这些胶原纤维都能正常地进行钙化并变为骨组织,因此丹参为骨折修复提供大量有机基质、胶原。

成纤维细胞核的条纹状变化应该是一种加速细胞核变性的变化,使细胞核可以更快地消失,从而加速了成纤维细胞的变性过程。在骨折愈合过程中,成纤维细胞的变性、坏死以至消失并不是一消极的过程。相反,这是骨折愈合中的一个自然过程,能使成纤维

细胞更快地被骨组织所替代⁽⁸⁾。因而,从骨折愈合的角度来看,丹参促进核条纹变化是具有积极意义的,可以促进骨折愈合。

钙是骨折愈合中基质钙化及骨化必不可少的成份。通常在软骨细胞、成骨细胞及骨细胞的线粒体内均有钙颗粒存在,而为钙化及骨化提供钙盐⁽¹²⁾。作者在实验研究中发现成纤维细胞线粒体内有钙颗粒⁽⁷⁾。本实验由于应用丹参,成纤维细胞线粒体内有众多的钙颗粒出现,由于有了钙颗粒才使成纤维细胞四周的基质小泡及胶原纤维有更丰富的钙盐结晶沉积。X线摄片检查发现,应用丹参使钙盐沉积早在第七天出现,即充分说明了丹参在促进钙化和骨化方面的有利作用。

骨折愈合若仅依靠成骨作用尚无法使断骨完全恢复正常或接近正常的解剖与功能。唯有在成骨的同时将多余的骨痂吸收掉,才能使改建顺利进行,髓腔再通。在这方面只有破骨细胞能起作用。应用丹参后,出现在各种骨痂部位的破骨细胞数量增多有利于骨改建,使骨折修复得更好更快。

参 考 文 献

- 1.上海市伤骨科研究所.伤科论文汇编.上海:上海科学技术出版社,1964:1—7.
- 2.柴本甫,等.理气药物对骨折愈合影响的初步研究.中华外科杂志 1962; 5:299.
- 3.胡美珠,等.丹参注射液对家兔桡骨骨折后肢体血容量的影响.中华外科杂志 1979; 17:33.
- 4.柴本甫,等.实验性骨折愈合的超微结构研究.中华外科杂志 1979; 17:368.
- 5.汤雪明,等.实验性骨折愈合的超微结构分析—光学显微镜和电子显微镜观察.中华医学杂志 1982; 62(1):18.
- 6.Ham AW, et al. Repair and transplantation of bone. In: Bourne GH, ed. The biochemistry and physiology of bone, 2nd edition, Vol. III, New York and London, 1971:337—379.
- 7.柴本甫,等.实验性骨折愈合的超微结构研究—基质小泡的电子显微镜观察.中华骨科杂志 1982; 2:117.
- 8.汤雪明,等.实验性骨折愈合的超微结构研究——成纤维细胞和软骨细胞演变和归缩的电镜观察.中华医学杂志 1980; 60(7):385.
- 9.Perry RP. Role of nucleolus in ribonucleic acid metabolism and other cellular process. Natn Cancer Inst Monogr 1964; 14:73.
- 10.Sobel HJ, et al. Non-viral nuclear inclusions. I. cytoplasmic invagination. Arch Path 1969; 87:179.
- 11.Ghadially FN. Ultrastructural pathology of the cell, 1st ed. London: Butterworth & Co. 1975:42.

丹参等药物对实验性肝脏微循环障碍 纠正作用的初步观察

解放军第95医院 叶荣森 唐奇光

1984年,我们进行了丹参等药物纠正实验性肝脏微循环的动物试验,现将方法及结果报告于下。

材料与方法 福建省防疫站提供的昆明种健康雄性小鼠70只,体重 $20 \pm 2g$,分七组。A组(单给肾上腺素对照组):肝表面滴肾上腺素 $10\mu g(0.02ml)$ 后不用任何药物。B组(生理盐水对照组):滴生理盐水 $0.1ml$ 。C组(阿托品组):滴阿托品(福州制药厂,批号820715) $0.1ml(0.1mg)$ 。D组(东莨菪碱组):滴东莨菪碱(广州第二制药厂,批号800319) $0.1ml(0.03mg)$ 。E组(654-2组):滴654-2(苏州长征制药厂,批号820811) $0.1ml(1mg)$ 。F组(丹参组):滴丹参注射液(本院自制,批号830203) $0.1ml$ (相当生药 $0.15g$)。G组(酚妥拉明阳性对照组):滴酚妥拉明(上海第十三制药厂,批号801221) $0.1ml(0.5mg)$ 。

实验方法:予试验选定阻断肝脏微循环药物肾上腺素,其最佳浓度为 $10\mu g/0.02ml$,维持室温 $15^{\circ}C$ 以上。将小鼠用10%乌拉坦腹腔麻醉后剖腹,置于微循环显微镜下,选择肝微循环活跃部位,于表面滴入肾上腺素 $10\mu g$,待肝窦血流完全停止后2分钟,滴入观察药物(其中除丹参为正常人用量的 $1/20$ 外,余均为 $1/10$),记录肝窦血流开始恢复的时间。

实验结果 见附表。

附表 药物滴入肝窦血流恢复的时间(分钟, $M \pm SD$)

组别	肝窦血流恢复时间	t 测 验 P 值					
		A	B	C	D	E	F
A	8.18 ± 1.51						
B	6.03 ± 1.28	>0.05					
C	2.28 ± 0.52	<0.01	<0.01				
D	2.85 ± 0.37	<0.01	<0.01	>0.01 <0.05			
E	2.73 ± 0.53	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05		
F	1.83 ± 0.45	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	
G	1.46 ± 0.27	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

讨 论 丹参注射液含有多种生物活性物质,具有扩张冠脉、降低血粘度、减轻红细胞聚集、加速血

流、增加毛细血管网开放等多种药理作用。本实验表明,丹参对肝脏微循环障碍也有良好的纠正作用。为保持各组容量的一致,丹参的剂量仅为其它药物的二分之一,但其促使肝窦血流的恢复时间接近酚妥拉明阳性对照组($t=2.022, P>0.05$),明显优于其他各组($P<0.01$)。实验中还可见到滴入丹参后,肝窦广泛开放,部分原先休止的肝窦也可开通。

从本实验将丹参液直接滴入肝脏表面所获得的结果看,以往临床上治疗肝病时丹参用量似嫌太小,如加大用量,疗效可能更好。

莨菪类药物对外周微循环具有明显的活跃扩张作用。本实验结果显示,其对肝脏微循环也有较好的活跃作用,用其治疗肝病是有一定药理基础的。本类药物对肝脏微循环的作用基本相似,临床上可根据病情灵活选用。

生理盐水组肝窦血流恢复时间较单给肾上腺素对照组短2分钟左右,说明其对肾上腺素有一定的冲刷稀释作用,但差异并不显著($P>0.05$),而各药物组在严格限定其容量与生理盐水完全相同的条件下(均为 $0.1ml$),与单滴肾上腺素对照组及生理盐水组的差异均非常显著,表明除稀释因素外,药物的药理效应起主导作用。

活血化瘀类药物已广泛应用于肝病临床,但它们究竟能在多大程度上改善肝脏微循环,尚无直接证据。本实验直接测定药物纠正肝微循环障碍的时间,从而加深了这类药物对肝脏微循环药理作用的认识。

更 正

本刊1987年第1期第4页(英文摘要第19行Chrysanthemum Morifolium应为 *Sterea rebaudiana* Bertonii)。

**Ultrastructural Observation on Experimental Fracture Treated with
Principle of Promoting Blood Circulation and Relieving Stasis
— A Transmission Electron Microscopic Study**

Chai Benfu (柴本甫), Tang Xueming (汤雪明) *

*Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics; * Shanghai Second Medical University, Shanghai*

In the course of healing the standardized fracture of radius in 50 New Zealand rabbits, an expeditious effect on repairing was achieved as a result of administration of *Radix Salviae miltiorrhizae* which exerted the action of promoting the blood circulation and relieving the stasis. X-ray study of the radial fracture revealed that callus formation appeared earlier and was denser as compared with another series of 50 control rabbits. As judged from the transmission electron microscope (TEM) observation, the favourable effects could be reflected in five aspects. Firstly, there was an increase in both the site of distribution and the number of the osteogenic cells. Secondly, the fibroblasts, in addition to their change in configuration, showed very active protein synthesis. There was also an expedition of the normal process of fibroblast degeneration. Thirdly, there was appearance of increased number of osteoclasts in different localities of fracture callus to promote remodelling. Fourthly, there was exuberant amount of collagen fibril formation in enhancing the production of the organic matrix. Fifthly, there was numerous dense calcium granules in the swollen mitochondria of the fibroblasts so as to provide adequate supply of calcium for the calcification of the matrix vesicles and the collagen fibrils.

(Original article on page 417)

Antiviral Efficacy of the Extract of *Luffa cylindrica* Vine in Vivo and in Vitro

Xu Zhaoxiang (许兆祥), Li Lei (李蕾), Qu Fenzhen (曲凤珍), et al

Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medical Sciences, Beijing

The antiviral activity of the extract of *Luffa cylindrica* vine (ELCV) on virus infection in vivo and in vitro was studied. Results from the study indicated that: (1) The mice resulted in a 66.7 ~ 80 % protection when the ELCV was given to mice prior to infection with Japanese encephalitis virus, but only a weak protection of the treated mice could be observed when given after infection; (2) The ELCV was highly active in inducing resistance to cytopathic changes in primary rabbit kidney cell cultures challenged with vesicular stomatitis virus; (3) Interferon was induced in rabbit by intravenous injection with the ELCV. The circulating serum interferon level peaked at 2 hr after injection; (4) The antiviral activity of the ELCV was greatly lowered by heating at 100 °C for 45 min. and was partially resistant to RNase at concentration of 20 µg/ml; (5) Ultraviolet spectrum of the ELCV revealed a pattern of nucleic acids.

(Original article on page 421)

Effects of Kidney Yin (阴) Tonic on Calcium and Phosphorus Metabolism in Rickety Chickens

Yin Yongshen (尹永谔), Li En (李恩), et al

Department of Biochemistry, Hebei Medical College, Shijiazhuang

100 chickens of 7 days after birth were divided into three groups randomly: The control group (I), the rickets group (II), the rickety chicken treated with kidney Yin tonic "Liuwei Dihuang decoction 六味地黄汤" (III) twice daily. All of them were fed with vitamin D-free diet. The group II and III were bred in darkroom except group I. Serum calcium and phosphorus concentration and alkaline phosphatase activity were determined once every two weeks. A significant reduction of mean calcium and phosphorus concentration and an increased alkaline phosphatase activity were observed in group II in comparison with group I and group III in certain periods. After two months, X-ray diagnosis also showed that the incidence of severe rickets in group II (65.5 %) was higher than that in group III (16.7 %). The mean calcium contents (mg/g of dry bone weight) in tibia of the three groups were 105, 92 and 97 respectively (I/II $P < 0.01$, II/III $P < 0.05$) and the phosphorus contents were 45, 40 and 44 respectively (I/II $P < 0.01$, II/III $P < 0.05$). The findings indicated that the tonic lowered the incidence of severe rickets might contain some natural anti-rickets components such as ergocalciferol or enhance the function of the kidney in regulating calcium and phosphorus balance.

(Original article on page 423)